

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВ

И. М. Бушмакина, М. А. Мартынова, М. М. Молчан, Н. А. Шуканова

ВЛИЯНИЕ ЗАРЯДА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНКОРПОРИРОВАНИЯ ПАКЛИТАКСЕЛА В ЛИПОСОМЫ

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
г. Минск, Республика Беларусь

Проведено изучение влияния зарядформирующих минорных компонентов на образование липосомального паклитаксела с высоким уровнем включения цитостатика и стабильность полученных липосом. Положительный заряд липосомальной мембраны получали, включая в ее состав стеарилэтаноламид или цетилтриметиламмоний бромид, а отрицательный – стеариновую кислоту. Сравнивали положительно заряженные, нейтральные и отрицательно заряженные наноразмерные липосомы, содержащие паклитаксел. Установлено, что наиболее стабильны при хранении в течение 6 месяцев и эффективно инкорпорируют активное вещество (до $94,1 \pm 2,8$ % от внесенного в инкубационную смесь) отрицательно заряженные липосомы, содержащие в своем составе стеариновую кислоту. Кроме того, изучено влияние разных видов липосомального паклитаксела на жизнеспособность и активность фермента ацетилхолинэстеразы в клетках эпителиальной карциномы шейки матки человека HeLa и клетках РМЖ в первичной культуре. Показано, что отрицательно заряженный нанолипосомальный паклитаксел обладает максимальным ингибирующим эффектом на эти параметры в изученных клеточных культурах.

Ключевые слова: нанолипосомальный паклитаксел, зарядформирующие минорные компоненты, ацетилхолинэстераза, рак молочной железы.

ВВЕДЕНИЕ

Паклитаксел – цитостатический препарат растительного происхождения, относящийся к таксанам. Этот алкалоид либо выделяют из коры тисового дерева (*Taxus brevifolia*), либо получают полусинтетическим или синтетическим путем. Оказывает цитотоксическое антимитотическое действие. Используют его как противоопухолевое средство для лечения рака молочной железы (РМЖ), рака яичников, немелкоклеточного рака легкого и др. Известно, что паклитаксел, как и все противоопухолевые средства, имеет много побочных эффектов. Он обладает высокой гематотоксичностью, кроме того, вызывает подавление костного мозга, тромбоцитопению, анемию, лейкопению и кровотечения. Поскольку паклитаксел высоко гидрофобен, то инъекционную форму препарата получают в сочетании с комплексным растворителем, вызывающим гипераллергическую реакцию. Токсична и сама субстанция. Одним из

наиболее эффективных подходов к решению этой проблемы, особенно в области онкологии, где применяются химиотерапевтические средства с высоким уровнем системной токсичности, является использование наноразмерных систем – переносчиков для адресной доставки препаратов в очаги поражения.

Из множества типов предложенных носителей, таких как наносферы, дендримеры, полимерные мицеллы, клеточные везикулы и др., именно липосомы, сформированные из фосфолипидных компонентов, отличаются наибольшей био- и гемосовместимостью. Поэтому на фармацевтическом рынке наномедицинские препараты на основе липосом, предназначенные для системного введения, занимают одну из лидирующих позиций [1, 2]. Кроме того, следует отметить, что липосомальные формы лекарственных средств являются комплексными препаратами для терапии злокачественных заболеваний, обеспечивающими синергизм действия фосфолипидной составляющей и активно-

го вещества. Показано, что липосомальная оболочка существенно снижает токсичность и аллергенность препарата не в ущерб терапевтической эффективности [3, 4]. Таким образом, получение нанолипосомальной формы паклитаксела является перспективным направлением в создании новой лекарственной формы известного цитостатика.

Цель исследования – изучение влияния зарядформирующих минорных компонентов на получение нанолипосомального паклитаксела с высоким уровнем инкорпорирования активного вещества и стабильностью при хранении, а также влияние полученного липосомального паклитаксела на жизнеспособность и активность фермента ацетилхолинэстеразы в клетках эпителиальной карциномы шейки матки человека HeLa и клетках РМЖ в первичной культуре.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Липосомальный паклитаксел получали из яичного фосфатидилхолина и холестерина в соотношении 10 : 5 моль/моль, паклитаксела в концентрации 2 мг/мл суспензии и 0,04 мг/мг суммарных липидов DL- α -токоферола. Суммарная концентрация всех липосомообразующих липидных компонентов составляла 50 мг на 1 мл суспензии. Исследования проводили на униламеллярных липосомах (УЛЛ), содержащих паклитаксел, различающихся минорными зарядформирующими компонентами. Зарядформирующий компонент вносили в концентрации 0,3 моля.

Концентрацию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли с помощью теста с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-теста). Степень инкапсулирования препарата в УЛЛ определяли методом гель-фильтрации. Форму и размеры УЛЛ, содержащих паклитаксел, определяли с использованием электронного микроскопа JEM-100CX (Япония).

Первичную культуру клеток РМЖ вели по разработанному нами методу, описанному ранее [5]. Клетки с образцами паклитаксела культивировали в CO₂-инкубаторе HERAcell 150 в течение 48 часов при 37 °С. Активность фермента ацетилхолинэстеразы в опухолевых клетках определяли стандартным способом с использованием реактива Элмана [6]. Обнаружение клеток,

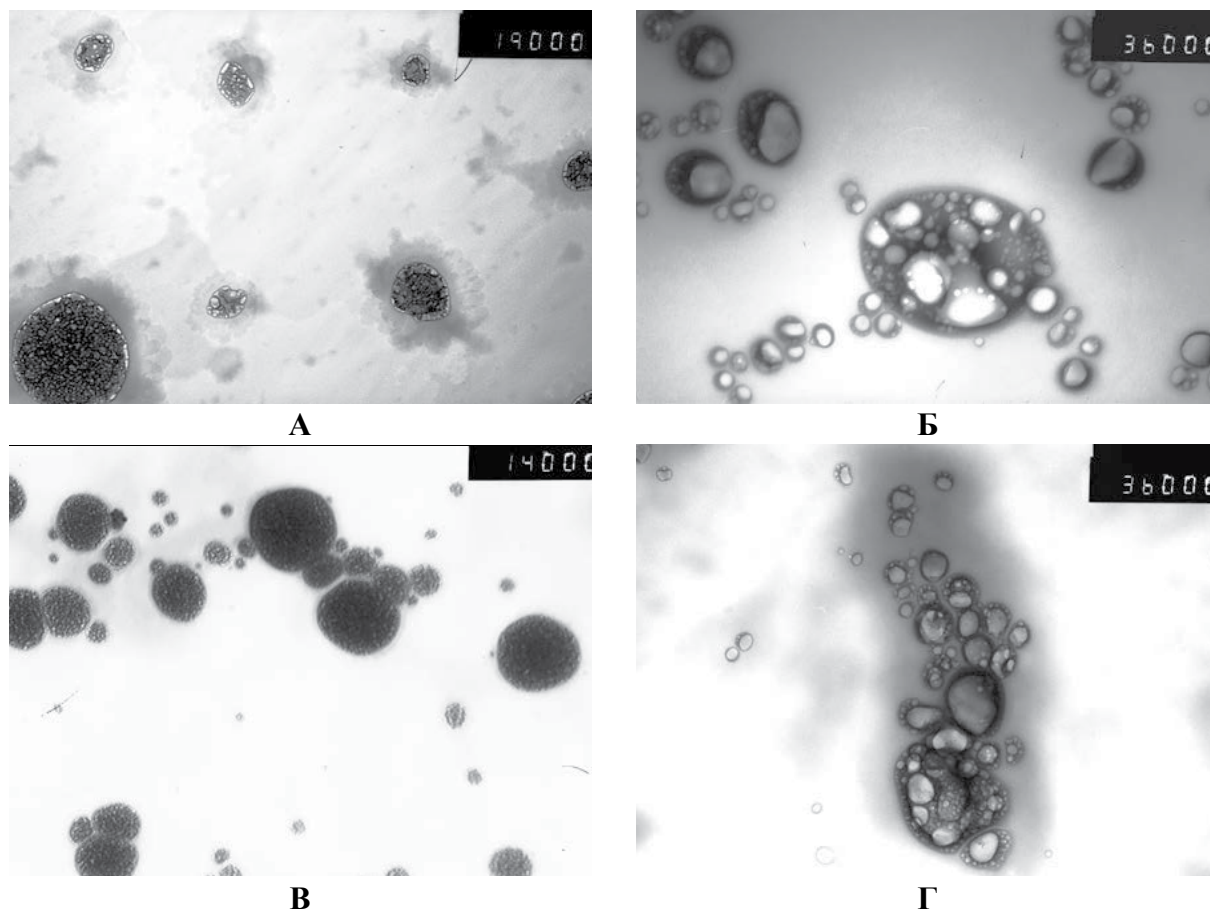
подвергшихся апоптозу, вели по инструкции, приложенной к коммерческому набору ANNEXIN V-FITC/7-AAD (Beckman Coulter, France), с последующей детекцией флуоресценции с использованием микроскопа FluorFAB.

В качестве минорного компонента, придающего липосомальной мембране положительный заряд, использовали стеарилэтаноламид (СЭА) и цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ), а отрицательный заряд на мембране наносом формировали добавлением стеариновой кислоты (СтК).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены электронные фотографии липосомального паклитаксела, различающегося зарядом. Установлено, что придание липосомальной мембране отрицательного заряда путем внесения стеариновой кислоты приводит к формированию стабильных преимущественно одиночных УЛЛ округлой формы (рисунок 1, Б), при этом большая часть везикул в липосомальной суспензии ($69,9 \pm 3,0$ %) имеет размеры 100–500 нм. Нанолипосомальный паклитаксел, не несущий на своей поверхности заряд, представляет собой преимущественно олиговезикулярные структуры (рисунок 1, А). Придание УЛЛ, содержащим паклитаксел, положительного заряда с помощью ЦТАБ приводит к появлению олиговезикулярных липосом, гетерогенных по размерам (рисунок 1, В), введение с этой целью СЭА приводит к агрегации получаемых УЛЛ (рисунок 1, Г).

Кроме того, установлено, что УЛЛ, несущие отрицательный заряд вследствие содержания в своей мембране стеариновой кислоты, наиболее эффективно инкапсулируют паклитаксел ($94,1 \pm 2,8$ % цитостатика от исходно внесенного в липосомообразующую смесь). Положительно заряженные липосомы инкорпорировать паклитаксел менее эффективно: липосомы, содержащие ЦТАБ, до $79,3 \pm 8,1$ % от исходно внесенного препарата, а СЭА – до $48,1 \pm 6,0$ % (рисунок 2). При этом утечка активного вещества из липосомальных везикул при хранении липосомального паклитаксела со стеариновой кислотой в течение полугода наблюдается на уровне статистической погрешности.



А – незаряженные липосомы, содержащие паклитаксел; Б – отрицательно заряженные липосомы (при наличии в составе СтК); В, Г – положительно заряженные липосомы (при наличии в составе ЦТАБ и СЭА соответственно)

Рисунок 1. – Электронные фотографии липосомального паклитаксела, различающегося наличием минорного зарядового компонента

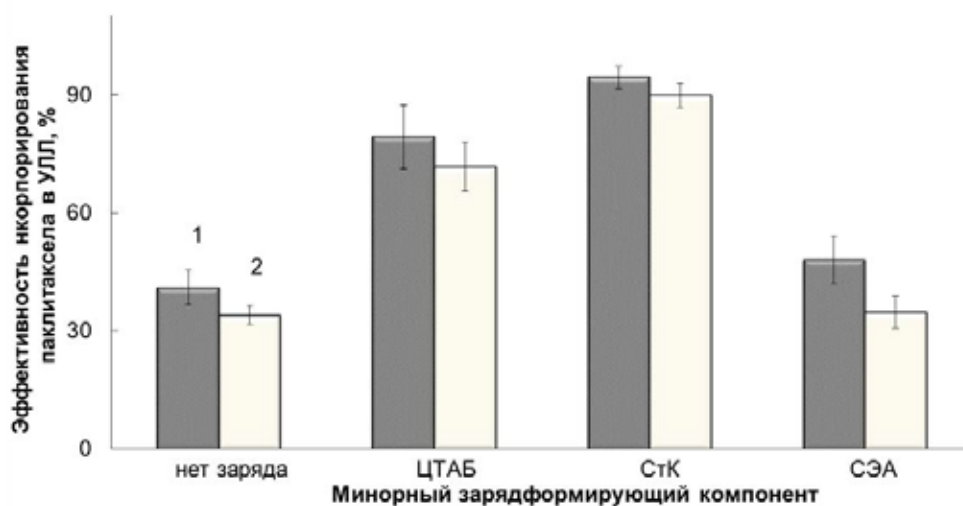
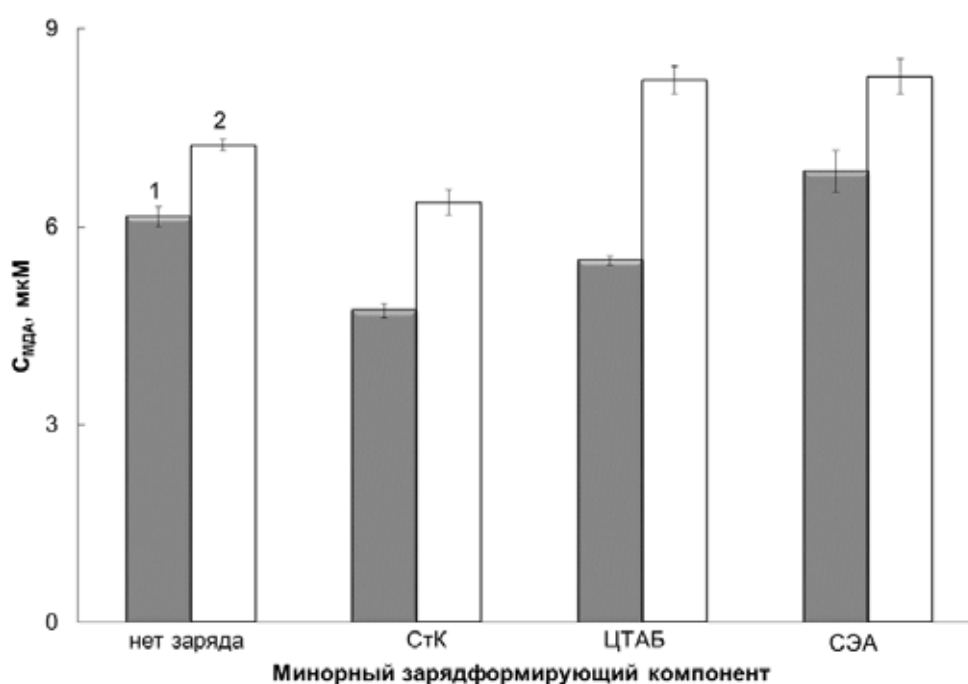


Рисунок 2. – Влияние минорных зарядформирующих компонентов на эффективность включения паклитаксела в свежеприготовленные УЛП (1) и удержания цитостатика в липосомах после 6-ти мес. хранения (2)

В следующей серии экспериментов мы изучали влияние заряда липосом на стабильность липосомального паклитаксела в процессе хранения. Нами осуществлялся контроль за протеканием в УЛЛ процессов ПОЛ на протяжении шести месяцев. Было установлено, что в свежеприготовленных отрицательно заряженных липосомах с включенным паклитакселом, наблюдается самый низкий уровень ТБК-активных продуктов: концентрация малонового диальдегида (МДА) составляет $4,73 \pm 0,08$ мкМ, то есть на 30,0 % ниже, чем в нейтральных липосомах (контроль). Можно предположить, что в данной липо-

сомальной композиции стеариновая кислота проявляет выраженный антиоксидантный эффект.

В положительно заряженных липосомах с паклитакселом наблюдается двоякая картина: внесение ЦТАБ незначительно (на 12 %) ингибирует процессы ПОЛ в липосомальном паклитакселе и уровень ТБК-активных продуктов составляет $5,50 \pm 0,05$ мкМ. В то же время липосоμοобразующая смесь, содержащая СЭА в УЛЛ с паклитакселом, наоборот, инициирует процессы пероксидного окисления липидов (по сравнению с контролем) и концентрация МДА достигает $6,84 \pm 0,26$ мкМ (рисунок 3).



1 – свежеприготовленные липосомы, 2 – после 6-ти мес. хранения

Рисунок 3. – Влияние зарядформирующих минорных компонентов на стабильность наносомального паклитаксела по ТБК-тесту

В течение 6 месяцев хранения процессы ПОЛ в нейтральных (контроль) липосомах с паклитакселом продолжали развиваться: концентрация МДА увеличилась на 17,5 % и составила $7,23 \pm 0,18$ мкМ, по сравнению со свежеприготовленными липосомами. Похожая картина наблюдалась в положительно заряженных УЛЛ с инкорпорированным паклитакселом. Так, в липосомах, содержащих ЦТАБ, количество ТБК-активных продуктов составило $8,22 \pm 0,27$ мкМ; а в липосомальном паклитакселе со СЭА – $8,94 \pm 0,20$ мкМ. Отрицательно заряженные липосомы ока-

зались значительно стабильнее при хранении нанолипосомального препарата: концентрация МДА через 6 месяцев составила $6,37 \pm 0,19$ мкМ.

В следующей серии экспериментов было изучено влияние нанолипосомальной формы паклитаксела с разным зарядом на злокачественные опухоли женских репродуктивных органов.

Установлено, что «пустые» (без лекарственной субстанции) незаряженные липосомы (контроль) и липосомальный паклитаксел без заряда при сравнении с традиционной формой паклитаксела,

ныне применяемой в клинических условиях, действовали на ацетилхолинэстеразу клеток HeLa и клеток РМЖ в первичной культуре аналогичным образом – уровень ингибирования активности фермента был невысок и сопоставим. Таким же образом влиял и положительно заряженный нанолипосомальный паклитаксел, содержащий в своем составе ЦТАБ. Паклитаксел, включенный в положительно заряженные липосомы, где заряд формировали включением СЭА, ингибировал активность ацетилхолинэстеразы опухолевых клеток на уровне до 10 %.

В то же время инкубация злокачественно трансформированных клеток с отрицательно заряженным (содержащим СтК) нанолипосомальным паклитакселем приводит к более значительному ингибированию активности ацетилхолинэстеразы клеток HeLa и РМЖ в первичной культуре до 30 %. В клинике химиотерапевтические эффекты применения цитостатических препаратов существенно иные вследствие использования, как правило, сочетаний двух или нескольких лекарственных средств. Следует отметить, что инкубация опухолевых клеток в течение уже трех часов с такой формой нанолипосомального паклитаксела приводила к снижению их жизнеспособности в 2 раза. Апоптотические клетки, положительно окрашенные аннексином FITC, выявлялись в культурах спустя 30 минут после добавления липосом. Возможно, полученные результаты исследования обусловлены тем, что отрицательно заряженный нанолипосомальный паклитаксел, как нами показано, наиболее эффективно инкорпорирует активное вещество и сохраняет стабильность при хранении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные, полученные при проведении экспериментов, позволяют сделать вывод, что цитостатический препарат «Паклитаксел» более эффективно инкапсулируется в отрицательно заряженные липосомы. К тому же такие УЛЛ стабильнее при хранении на протяжении 6-ти месяцев: утечка из липосом противоопухолевой субстанции минимальна и процессы ПОЛ развиваются менее интенсивно, чем в положительно заряженных липосомах. Кроме того, такие липосомы проявляют и более выраженный

цитостатический эффект по отношению к опухолевым клеткам в условиях *in vitro*.

SUMMARY

I. M. Bushmakina, M. A. Martynova,
M. M. Molchan, N. A. Shukanova
CHARGE EFFECT ON THE EFFICIENCY
OF PACLITAXEL INCORPORATION
INTO LIPOSOMES

The effect of the charge-forming minor components on liposomal paclitaxel formation with a high level of cytostatic inclusion and the stability of the liposomes obtained was studied. A positive charge of the liposomal membrane was obtained including stearyl ethanolamide or cetyltrimethylammonium bromide in its composition, and negative – including stearic acid. Positively charged, neutral, and negatively charged nano-sized liposomes containing paclitaxel were compared. Negatively charged liposomes containing stearic acid in its composition were found to be the most stable when stored for 6 months and these effectively incorporate the active substance (up to 94,1±2,8 % of the introduced in the incubation mixture). Besides, the effect of different types of liposomal paclitaxel on the viability and acetylcholinesterase activity in the human cervical epithelial carcinoma cells HeLa and breast cancer cells in the primary culture was studied. Negatively charged nanoliposomal paclitaxel was shown to have maximum inhibitory effect on these parameters in the cell cultures studied.

Keywords: nanoliposomal paclitaxel, charge-forming minor components, acetylcholinesterase, breast cancer.

ЛИТЕРАТУРА

1. Свистельник, А. В. Липосомальные лекарственные препараты: возможности и перспективы / А. В. Свистельник, А. Л. Ханин // Медицина в Кубани. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 7–16.
2. Бушмакина, И. М. Инкорпорирование гидрофобных лекарственных соединений в липосомы: физико-химические факторы, определяющие эффективность их встраивания и стабильность лекарственной формы: дис. ... к-та биол. наук: 03.01.02 / И. М. Бушмакина. – Минск, 2012. – 169 л.
3. Adler-Moore, J. P. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B / J. P. Adler-Moore, J. P. Gangneux,

P. G. Pappas // Med Mycol. – 2016. – Vol. 54, № 3. – P. 223–231.

4. Монотерапия прогрессирующего метастатического рака молочной железы пегилированным липосомальным доксорубицином / Д. М. Пономаренко [и др.] // Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология. – 2017. – № 2. – С. 32–34.

5. Активность ацетилхолинэстеразы в первичной культуре раковой ткани молочной железы пациентки – прогностический показатель реакции организма на полихимиотерапию / Н. А. Шуканова [и др.] // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. статей междунар. науч. конф., XII съезда Бел. обществ. объединения фотобиол. и биофиз., Минск, 28–30 июня 2016 г.: в 2 т. / БГУ, Ин-т биофизики и клеточной инже-

нерии НАН Беларуси, БООФиБ ; редкол.: И. Д. Волоотовский [и др.]. – Минск, 2016. – Т. 1. – С. 400–402.

6. Прогностические факторы при лечении рака молочной железы / Н. А. Шуканова [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 4. – С. 104–108.

Адрес для корреспонденции:

220072, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. Академическая, 27,
Институт биофизики и клеточной
инженерии НАН Беларуси,
лаборатория иммунологии и клеточной биофизики,
тел.: (017) 2842361,
e-mail: bushm-im@yandex.ru,
Бушмакина И. М.

Поступила 29.03.2019 г.

Б. А. Мовчан, А. В. Горностай

НАНОЧАСТИЦЫ МЕТАЛЛОВ В ВОДНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТАХ: МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ И СТРУКТУРА

**Международный центр электронно-лучевых технологий ИЭС им. Е. О. Патона
НАН Украины, г. Киев, Украина**

В данной статье представлен двухстадийный метод получения наночастиц металлов в водных экстрактах из растительного сырья. Метод заключается в физическом осаждении дискретных покрытий металлов на поверхность растительных объектов с помощью технологии Electron Beam Physical Vapor Deposition (EB-PVD) и последующем экстрагировании этих сочетаний в объем деионизированной воды. Исследована форма и структура: средний размер частиц, а также диапазон распределения по размеру полученных наночастиц металлов методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС), растровой электронной микроскопии (РЭМ). Также приведены примеры лабораторного и промышленного оборудования EB-PVD для синтеза наноразмерных структур на поверхности растительных объектов.

Ключевые слова: экстракты, получение наночастиц, серебро, медь, железо, EB-PVD, нанотехнология, растительные матрицы.

ВВЕДЕНИЕ

Современный прогресс в области новых конструкционных и функциональных материалов определяют композиционные материалы с наноразмерными структурными элементами. Состав → структура → свойства – аксиома материаловедения, «дорожный указатель» при разработке новых материалов. Анализируя современные материалы, можно видеть, что в этом дви-

жении лидируют материалы со структурными элементами в размерном интервале 1–100 нм. Происходит дальнейшее совершенствование композиционных материалов с наночастицами серебра, в первую очередь для медицины (фармации).

Нанотехнологии и наноматериалы являются фундаментом научно-технической революции в XXI веке. В настоящее время существует много методов синтеза наночастиц. Условно их можно разделить на